



1

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12N 5/10, 15/12, 15/37 C12N 15/85, 15/89, A61K 48/00 A01K 67/027	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 92/10563 (43) Date de publication internationale: 25 juin 1992 (25.06.92)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR91/00983 (22) Date de dépôt international: 9 décembre 1991 (09.12.91) (30) Données relatives à la priorité: 90/15412 10 décembre 1990 (10.12.90) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): UNIVERSITE PARIS VII [FR/FR]; 2, place Jussieu, F-75005 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : PAULIN, Denise [FR/FR]; 7, rue de Montreuil, F-94300 Vincennes (FR). VICART, Patrick [FR/FR]; 22, chemin des Montquartiers, F-92130 Issy-les-Monlignaux (FR).	(74) Mandataire: CABINET ORES; 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR). (81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet européen), CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), GR (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), MC (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US. Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>	
(54) Title: IMMORTALIZED CELL LINES AND APPLICATIONS THEREOF, ESPECIALLY FOR THE PRODUCTION OF DIFFERENTIATED CELLS (54) Titre: LIGNEES DE CELLULES IMMORTALISEES ET LEURS APPLICATIONS, NOTAMMENT A LA PRODUCTION DE CELLULES DIFFERENCIEES (57) Abstract <p>Immortalized cell lines preserving the same properties as those of differentiated cells or primary precursors of the original donor, applications thereof as a system for the production of differentiated cells in large numbers and model for studying the physiopathology of the differentiated cells obtained. Application of said differentiated cells and/or precursors as an agent serving a preventive and/or therapeutic function, especially in the treatment of genetic diseases, and more particularly, myopathies. Said immortalized cell lines are obtained by appropriately transforming suitable primary cells, derived from the organ of a suitable animal such as a mammal or a bird, with a nucleic acid fragment comprising a suitable immortalizing viral oncogene, at least one fragment of the regulating zones of the vimentin human gene and optionally a gene lacking its promotor whose activity is readily detectable either by using a simple enzymatic test or because it imparts resistance to an antibiotic.</p> (57) Abrégé <p>Lignées de cellules immortalisées conservant les mêmes propriétés que les cellules différenciées ou précurseurs primaires du donneur d'origine, leurs applications en tant que système de production de cellules différenciées en grand nombre et modèle d'étude de la physiopathologie des cellules différenciées obtenues. Application desdites cellules différenciées et/ou précurseurs comme agent à visée préventive et/ou thérapeutique, notamment dans le traitement des maladies génétiques, et plus particulièrement dans les myopathies. Lesdites lignées cellulaires immortalisées sont obtenues par transformation appropriée de cellules primaires convenables, -issues d'un organe d'animal approprié, notamment un mammifère ou un oiseau, -par un fragment d'acide nucléique comprenant un oncogène viral immortalisant approprié, au moins un fragment des régions régulatrices du gène humain de la vimentine et éventuellement un gène dépourvu de son promoteur, mais dont l'activité est aisément détectable soit par un test enzymatique simple, soit par le fait qu'il confère une résistance à un antibiotique.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	ES	Espagne	MG	Madagascar
AU	Australie	FI	Finlande	ML	Mali
BB	Barbade	FR	France	MN	Mongolie
BE	Belgique	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BF	Burkina Faso	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BG	Bulgarie	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BJ	Bénin	GR	Grèce	NO	Norvège
BR	Brésil	HU	Hongrie	PL	Pologne
CA	Canada	IT	Italie	RO	Roumanie
CF	République Centrafricaine	JP	Japon	SD	Soudan
CG	Congo	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SU ⁺	Union soviétique
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TC	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark				

+ Toute désignation de "SU" produit ses effets dans la Fédération de Russie. On ignore encore si une telle désignation produit ses effets dans les autres Etats de l'ancienne Union soviétique.

**LIGNEES DE CELLULES IMMORTALISEES ET LEURS APPLICATIONS,
NOTAMMENT A LA PRODUCTION DE CELLULES DIFFERENCIEES.**

La présente invention est relative à des lignées de cellules immortalisées conservant les mêmes
5 propriétés que les cellules différenciées ou précurseurs primaires du donneur d'origine, à leurs applications en tant que système de production de cellules différenciées en grand nombre et en tant que modèle d'étude de la physiopathologie des cellules différenciées obtenues.

10 La présente invention est également relative à l'application desdites cellules différenciées et/ou précurseurs comme agent à visée préventive et/ou thérapeutique, notamment dans le traitement des maladies génétiques, et plus particulièrement dans les myopathies.

15 Les lignées cellulaires immortalisées de l'Art antérieur ne permettent pas d'obtenir des cellules différenciées ayant les mêmes propriétés que les cellules qui se différencient normalement dans l'organisme vivant, pour former notamment un organe ; de plus, les lignées
20 cellulaires immortalisées décrites dans l'Art antérieur sont spécifiques d'un organe ou d'un type cellulaire.

La Demande Internationale PCT WO 89/09816, au nom de MASSACHUSSETS INSTITUTE OF TECHNOLOGY décrit, par exemple, une lignée cellulaire immortalisée produite par
25 incorporation dans des cellules précurseurs appropriées, d'un gène stimulateur de multiplication, qui est capable de permettre auxdites cellules de se multiplier, lequel gène est contrôlé par un facteur externe. Plus spécifiquement, cette Demande PCT décrit une lignée cellulaire
30 immortalisée produite par incorporation, dans des cellules du système nerveux embryonnaire, d'un vecteur rétroviral comprenant un gène de multiplication, qui correspond au domaine sensible à la température de la souche tsA58 du virus SV40 et un gène résistant à un
35 médicament, notamment à un antibiotique.

Toutefois, le modèle proposé dans cette Demande internationale PCT est spécifique des cellules nerveuses ; de plus, il comprend un vecteur rétroviral, comprenant un promoteur viral, qui comporte un certain
5 nombre d'inconvénients, notamment les risques liés à la présence d'un fragment d'origine virale.

Les Inventeurs se sont, en conséquence, donné pour but de pourvoir à des lignées de cellules immortalisées, permettant l'obtention de cellules différenciées
10 présentant les caractéristiques des cellules différenciées obtenues normalement à partir de cellules primaires, quelle que soit la cellule d'origine.

La présente invention a pour objet des lignées cellulaires immortalisées, caractérisées en ce qu'elles
15 sont obtenues par transformation appropriée de cellules primaires convenables, -issues d'un organe d'animal approprié, notamment un mammifère ou un oiseau,- par un fragment d'acide nucléique comprenant un oncogène viral immortalisant approprié, au moins un fragment des régions
20 régulatrices du gène humain de la vimentine et éventuellement un gène dépourvu de son promoteur, mais dont l'activité est aisément détectable soit par un test enzymatique simple, soit par le fait qu'il confère une résistance à un antibiotique, lequel gène permet la sélection
25 des transformants.

Selon un mode de réalisation avantageux desdites lignées cellulaires, l'oncogène viral immortalisant est choisi dans le groupe qui comprend l'oncogène T/t de SV40, l'oncogène ^tST/ Δ t de SV40, l'oncogène T/ Δ t
30 de SV40 et la région du gène immortalisant de l'adénovirus, du virus Eptsein-Barr ou du virus herpétique.

Conformément à l'invention, le fragment des régions régulatrices du gène humain de la vimentine est,
35 de préférence, le promoteur de la vimentine et plus particulièrement le fragment d'acide nucléique du promoteur

de la vimentine, compris entre les bases -830 et +93 de la séquence régulatrice de la vimentine.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, le fragment d'acide nucléique du promoteur de la vimentine comprend les bases -830 à -529 et/ou le fragment -540 à -140, situés en amont du site cap.

Un tel fragment d'acide nucléique hybride (oncogène grand T de SV 40 associé au promoteur de la vimentine) a notamment été décrit dans la Demande de Brevet européen n° 90402009.6 et est notamment incorporé dans un plasmide dénommé pHuVim830-T/t.

Dans la présente invention, on entend par gène grand T, le gène qui exprime à la fois la protéine T et la protéine t (symbolisé T/t), alors que le gène T/ Δ t n'exprime que la protéine grand T (Δ t correspond à la délétion du gène petit t).

Les Inventeurs ont mis au point une séquence qui contient le gène grand T thermosensible (ts) $t^{ST}/\Delta t$ et le promoteur de la vimentine, laquelle séquence a l'avantage de n'exprimer conditionnellement que la protéine grand T et d'être activée par le promoteur de la vimentine ; de plus, ce gène grand T est modifié de manière à être thermosensible. Cette séquence peut notamment être insérée dans un plasmide, dénommé par les Inventeurs pHuVim830- $t^{ST}/\Delta t$.

Les lignées cellulaires conformes à l'invention, en raison de l'association fragment d'ADN codant pour l'antigène T du virus SV40 et promoteur de la vimentine, -qui constitue l'activateur du gène immortalisant associé-, présentent un certain nombre d'avantages, notamment liés à la présence du promoteur de la vimentine.

La vimentine est un polypeptide que l'on retrouve dans les cellules dérivées du mésenchyme. Il s'agit d'une protéine de structure des cellules ; le gène de la vimentine joue notamment un rôle dans la croissance

cellulaire, la différenciation et le développement cellulaire.

La combinaison gène d'expression de l'antigène T du SV40 et promoteur de la vimentine a notamment l'avantage de permettre un contrôle spécifique de la différenciation cellulaire :

- l'activation du gène de l'antigène T est réalisée par le promoteur de la vimentine, en présence d'un agent mitogène approprié, éventuellement associé à des protéines qui se fixent sur un site du promoteur de la vimentine ; il en ressort qu'en l'absence d'agent mitogène, le promoteur de la vimentine est réprimé,

- l'antigène T lui-même, lorsqu'il est produit, active le promoteur de la vimentine, par action sur certains sites du promoteur de la vimentine sur lesquels peuvent se fixer des protéines activatrices (AP1, c-fos, NK-KB) et l'antigène T lui-même.

Une telle combinaison a également l'avantage de ne pas être spécifique vis-à-vis d'une cellule ou d'un organe, mais au contraire de permettre l'immortalisation de n'importe quelle cellule, tout en gardant les potentialités de différenciation de la cellule immortalisée.

La combinaison gène d'expression de l'antigène T sensible à la chaleur et promoteur de la vimentine, a de plus l'avantage de permettre un double contrôle, tant au niveau de l'antigène T lui-même (température d'activation, 34°C par exemple) que du promoteur de la vimentine (répression lorsque l'antigène T n'est plus fonctionnel), cette combinaison ayant de plus l'avantage de ne pas contenir le gène t, évitant ainsi des perturbations au niveau de la membrane cellulaire.

Selon un autre mode de réalisation avantageux desdites lignées, les cellules primaires sont avantageusement choisies dans le groupe qui comprend les cellules musculaires précurseurs de mammifère et plus parti-

culièrement les myoblastes, les cellules épithéliales de mammifère et les cellules endothéliales de mammifère.

Conformément à l'invention, les cellules musculaires précurseurs sont, de préférence, choisies dans le groupe qui comprend les myoblastes normaux de souris, les myoblastes mutants de souris et les myoblastes mutants humains.

Les myoblastes mutants de souris sont avantageusement choisis dans le groupe qui comprend des myoblastes de dysgénésie musculaire, notamment dénommés myoblastes mdg et mdx et les myoblastes mutants humains sont notamment choisis dans le groupe qui comprend les cellules DMD et les cellules STEINERT.

La lignée de cellules immortalisées conforme à l'invention est avantageusement obtenue par transfection des cellules primaires appropriées par un plasmide choisi dans le groupe qui comprend le plasmide pHuVim830-^{ts}T/Δt, le plasmide pHuVim830-T/Δt et le plasmide pHuVim830-T/t.

Conformément à l'invention :

- la lignée, dénommée HVM, est obtenue par transfection de myoblastes normaux de souris par un plasmide pHuVim830-^{ts}T/Δt et a été déposée sous le n° I-1019 en date du 7 décembre 1990 auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes tenue par l'INSTITUT PASTEUR.

- la lignée dénommée HVMD est obtenue par transfection de myoblastes mutants mdg de souris par un plasmide pHuVim830-^{ts}T/Δt et a été déposée sous le n° I-1020 en date du 7 décembre 1990 auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes tenue par l'INSTITUT PASTEUR.

Selon une autre disposition avantageuse de ce mode de réalisation, la lignée cellulaire est obtenue par microinjection d'une séquence linéaire d'acide nucléique appropriée, obtenue à partir d'un plasmide choisi dans le groupe qui comprend le plasmide pHuVim830-^{ts}T/Δt, le

plasmide pHuVim830-T/ Δ t et le plasmide pHuVim830-T/t, dans des cellules primaires convenables.

Conformément à l'invention, la lignée dénommée HVE est obtenue par microinjection d'un plasmide
5 pHuVim830-T/t linéarisé dans des cellules endothéliales humaines du cordon ombilical et a été déposée sous le n° I-1016 en date du 3 décembre 1990 auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes tenue par l'INSTITUT PASTEUR.

10 On obtient ainsi des lignées cellulaires présentant un taux de multiplication élevé.

On peut en outre citer, à titre d'exemples non limitatifs, comme autres lignées conformes à l'invention, des cellules endothéliales porcines (aorte), des cellules
15 endothéliales de lapin (veine marginale de l'oreille), des cellules épithéliales mammaires de lapin, des cellules épithéliales de l'oviducte bovin, des cellules mésangiales du rein de souris, des cellules endothéliales de cerveau de souris, des cellules musculaires humaines
20 normales et dystrophiques.

La présente invention a également pour objet un procédé d'obtention de cellules musculaires (myotubes) différenciées, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

25 (a) culture d'une lignée cellulaire musculaire immortalisée, conforme à l'invention, comprenant un plasmide contenant un oncogène viral immortalisant thermosensible, notamment le plasmide pHuVim830-^{ts}T/ Δ t, sur un milieu approprié, contenant une quantité appropriée de
30 sérum d'un animal convenable, à une température comprise entre 34°C et 36°C, permettant l'expression conditionnelle d'une protéine virale, et notamment de l'antigène ^{ts}T et une multiplication cellulaire importante ;

(b) modification de la température des
35 cellules en culture à une température comprise entre 38°C et 40°C, associée, éventuellement, à une modification du

milieu de culture, notamment par diminution de la concentration en sérum dudit milieu et/ou utilisation d'un sérum d'un animal différent de celui de l'étape (a) ; et

(c) obtention de cellules différenciées en grand nombre par culture desdites cellules dans les conditions appropriées à la différenciation de l'étape (b).

Dans les cellules différenciées ainsi obtenues (stade myotubes), le promoteur de la vimentine est réprimé et la protéine T n'est pas fonctionnelle.

En variante, le procédé d'obtention de cellules musculaires (myotubes) différenciées comprend les étapes suivantes :

(a) culture d'une lignée cellulaire musculaire immortalisée, conforme à l'invention, comprenant un plasmide contenant un oncogène viral immortalisant, notamment un plasmide choisi dans le groupe qui comprend le plasmide pHuVim830-T/t et le plasmide pHuVim830-T/ Δ t, sur un milieu approprié, contenant une quantité convenable de sérum d'un animal convenable, à une température appropriée notamment 37°C ;

(b) modification du milieu de culture, notamment par diminution de la concentration en sérum dudit milieu ;

(c) obtention de cellules différenciées en grand nombre par culture desdites cellules dans les conditions appropriées à la différenciation de l'étape (b).

La présente invention a également pour objet un procédé d'obtention de cellules épithéliales ou endothéliales différenciées, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

(a) culture d'une lignée cellulaire épithéliale ou endothéliale, conforme à l'invention en présence d'un agent d'activation approprié, qui conditionne l'expression d'une protéine virale appropriée et

notamment de l'antigène T en présence du promoteur de la vimentine et permet une multiplication cellulaire importante ;

(b) transfert de ladite lignée immortalisée
5 dans un milieu dépourvu en agent d'activation et/ou à une température comprise entre 37°C et 40°C ; et

(c) obtention de cellules différenciées en grand nombre.

Selon un mode de mise en oeuvre avantageux
10 dudit procédé, l'agent d'activation est notamment choisi dans le groupe qui comprend l'antigène T lui-même et des agents mitogènes appropriés.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de mise en oeuvre, l'agent mitogène est notamment choisi
15 dans le groupe qui comprend les sérums, les facteurs de croissance tels que le PDGF, l'EGF ou le FGF, l'interleukine II, les interférons et la phytohémagglutinine (PHA).

Lorsque l'agent d'activation consiste en
20 l'antigène T lui-même, il agit sur certains sites du promoteur de la vimentine et active ainsi le promoteur ; puis, le promoteur activé active ensuite l'antigène T.

Lorsque l'agent d'activation consiste en du sérum, ce dernier agit plus particulièrement sur les pro-
25 téines AP1, c-fos et NF-KB, qui se fixent sur l'acide nucléique du promoteur de la vimentine au niveau notamment des bases -707, -693, -197, -195 et -227, permettant au gène codant pour l'antigène T, d'exprimer ledit antigène.

30 La présente invention a également pour objet les cellules différenciées obtenues par l'un quelconque des procédés d'obtention de cellules différenciées décrits ci-dessus.

Les cellules différenciées ou précurseurs
35 conformes à l'invention trouvent notamment application comme agent à visée préventive, vaccin par exemple,

notamment par adjonction d'un fragment d'acide nucléique d'un virus approprié et/ou comme agent à visée thérapeutique, notamment par adjonction d'un fragment d'acide nucléique dit "correcteur", plus spécifiquement dans le traitement de maladies génétiques, par exemple les myopathies.

En effet, dans de telles cellules, le promoteur de la vimentine est réprimé ; de plus, elles n'expriment plus l'antigène T.

La présente invention a également pour objet un agent à visée préventive et/ou thérapeutique, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une cellule différenciée conforme à l'invention, éventuellement modifiée par adjonction d'un fragment d'acide nucléique approprié et éventuellement associée à au moins un véhicule pharmaceutique approprié.

La présente invention a également pour objet un agent à visée préventive et/ou thérapeutique, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une lignée cellulaire conforme à l'invention, éventuellement modifiée par adjonction d'un fragment d'acide nucléique approprié et éventuellement associée à au moins un véhicule pharmaceutique approprié.

La présente invention a, de plus, pour objet un modèle d'étude et d'identification des systèmes biochimiques dont l'expression nucléaire, cytoplasmique ou membranaire est impliquée dans la prolifération et la différenciation cellulaire des cellules musculaires, épithéliales, endothéliales ou nerveuses, caractérisé en ce qu'il est constitué par une lignée cellulaire conforme à l'invention.

La présente invention a, en outre, pour objet une séquence d'acide nucléique, caractérisée en ce qu'elle comprend successivement :

- une séquence codant pour l'antigène grand T de SV40, ne comportant pas le fragment codant pour

l'antigène petit t, laquelle séquence est thermosensible, ou un fragment de celle-ci ;

- une séquence comprenant au moins un fragment des régions régulatrices du gène humain de la vimentine et notamment au moins un fragment du promoteur de la vimentine humaine, d'une longueur de 830 paires de bases à partir du site cap ou un fragment de celle-ci, notamment le fragment -830 à -529 et/ou le fragment -540 à -140, en amont dudit site cap ; et, éventuellement

- un gène, dépourvu de son promoteur, mais dont l'activité est aisément détectable soit par un test enzymatique simple, soit par le fait qu'il confère une résistance à un antibiotique.

Une telle séquence peut notamment être insérée dans un vecteur approprié, notamment un plasmide, lequel vecteur est apte à immortaliser une lignée cellulaire appropriée ; un tel plasmide a été dénommé, comme précisé plus haut, pHuVim830-^{ts}T/Δt par les Inventeurs.

La présente invention a, de plus, pour objet une méthode de production d'un mammifère transgénique non humain, caractérisée en ce qu'elle comprend l'introduction d'un plasmide choisi dans le groupe qui comprend le plasmide pHuVim830-T/t, le plasmide pHuVim830-T/Δt et le plasmide pHuVim830-^{ts}T/Δt dans un mammifère non humain à un stade embryonnaire précoce.

La présente invention a également pour objet un mammifère transgénique non humain, caractérisé en ce qu'il est obtenu par la méthode ci-dessus décrite, et en ce que les cellules comprenant le plasmide choisi dans le groupe qui comprend le plasmide pHuVim830-T/t, le plasmide pHuVim830-T/Δt et le plasmide pHuVim830-^{ts}T/Δt, peuvent se différencier normalement *in vivo*, tout en pouvant produire des cellules immortalisées *in vitro*.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se

réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

Exemple 1 : Préparation des plasmides.

1) Plasmide pHuVim830-T/t

Ce plasmide est décrit dans la Demande de Brevet européen 90402009.6 ; il exprime l'antigène grand T et l'antigène petit t. Le fragment -830 - +93 du promoteur de la vimentine est cloné dans un plasmide pUC 18 ; les clones sont obtenus par digestion de la séquence 5' du gène de la vimentine au niveau du site de l'enzyme de restriction Pvu II. Le plasmide pUC 18 contenant le fragment d'ADN du promoteur de la vimentine est linéarisé par l'enzyme de restriction Xba I ; on obtient une extrémité 3' cohésive, qui est ajustée de manière à obtenir une extrémité franche, puis on lie le fragment d'ADN du promoteur de la vimentine ainsi obtenu avec le fragment d'ADN de l'antigène T, par ligation de l'extrémité 3' Xba I du promoteur avec l'extrémité Sfi I du fragment SV40. Les extrémités BamH I 5' et 3' sont liées en présence de T4 ligase. Les séquences codant pour l'antigène T sont ainsi sous le contrôle de la région régulatrice de la vimentine de 830 paires de bases.

2) Plasmide pHuVim830-^{ts}T/Δt :

Ce plasmide contient la séquence codant pour l'antigène grand T dans laquelle les nucléotides 4630 à 4900 ont été retirés. Ce plasmide n'exprime plus la protéine t et l'expression de la protéine T est thermosensible. Cette thermosensibilité est obtenue à l'aide d'une mutation au niveau du nucléotide 3505.

Le plasmide qui n'exprime que la protéine T, est activé par le gène de la vimentine humaine.

La séquence codant pour l'antigène T commence en position 5234 et s'arrête en position 2533 ; ce fragment est généré par digestion de l'ADN de SV40 par les enzymes de restriction suivantes : Sfi I, (position 5234) et BamH I (position 2533). La figure 1 décrit plus précisément ce plasmide, qui comprend successivement un fragment de 830 paires de bases du promoteur humain de la vimentine, la séquence codant pour l'antigène T et le plasmide pUC18.

Exemple 2 : Production de lignées cellulaires musculaires précurseurs conformes à l'invention et cellules musculaires différenciées, obtenues à partir de ces lignées.

a- Lignées cellulaires musculaires précurseurs :

Les myoblastes immortalisés sont obtenus par transfection avec le plasmide pHuVim-^{ts}T/Δt décrit ci-dessus, à 34°C dans un milieu DMEM contenant du sérum de veau foetal à 20 %. Dans ces conditions, toutes les cellules expriment l'antigène T (figures 2A et 2B), indiquant qu'elles ont toutes intégrées le plasmide ; en effet, à 34°C la protéine grand T fonctionnelle induit la multiplication et l'immortalisation de la cellule. Ces figures 2A et 2B représentent l'immunofluorescence indirecte obtenue, lorsqu'une lignée cellulaire immortalisée, réalisée à partir de myoblastes normaux (figure 2A) ou de myoblastes *mdg* (figure 2B), est mise en contact avec des anticorps monoclonaux anti-protéine T ; à 34°C, tous les noyaux cellulaires expriment l'antigène T.

La synthèse de la protéine grand T est caractérisée après électrophorèse d'extraits myoblastiques après couplage avec des anticorps spécifiques dirigés contre ladite protéine T. La quantité de protéine T est similaire dans les myoblastes normaux et dans les myoblastes *mdg*.

L'analyse de l'ADN génomique révèle que le gène recombinant est intégré (figures 3A et 3B). Ces

figures représentent l'intégration du plasmide pHuVim830-
tST/Δt dans les cellules musculaires. L'ADN des cellules
immortalisées est traité par l'enzyme de restriction
Hinc II, puis est soumis à une électrophorèse sur gel,
5 suivie d'un transfert sur bande de nitrocellulose ; on
procède ensuite à une incubation avec une sonde d'ADN
marquée au ³²P (³²P dCTP), correspondant au fragment
codant pour l'antigène T (les 632 derniers nucléotides du
gène SV40 T (Amersham Multiprime kit) ; si le fragment
10 est effectivement intégré, on observe une bande d'environ
1 kb (figure 3A : muscle normal, souche sauvage ; figure
3B : muscle *mdg*, dysgénésie musculaire g).

Le temps de doublement de ces cellules immor-
talisées est d'environ 24 heures.

15 b- obtention de cellules musculaires différen-
ciées :

Les lignées cellulaires obtenues ci-dessus,
sont mises dans des conditions de différenciation appro-
priées à savoir à 39°C, dans un milieu DMEM contenant du
20 sérum de cheval à 10 %.

La thermosensibilité de l'expression de
l'antigène T conduit à une augmentation de la différen-
ciation terminale, lorsque l'antigène T est réprimé. Dans
ces conditions de différenciation (39°C, milieu DMEM
25 contenant du sérum de cheval à 10 %), les cellules
mononucléées (myoblastes) non fusionnées expriment la
protéine T alors que les myoblastes fusionnés (myotubes
multinucléés) n'expriment pas la protéine T, indiquant la
répression du promoteur de la vimentine au stade myo-
30 tubes.

Les souris normales et les souris présentant
une dysgénésie musculaire (souris dites *mdg*), sont
capables de former des myotubes. Deux clones ont plus
particulièrement été étudiés HMV pour les myoblastes nor-
35 maux et HMVd pour la dysgénésie musculaire.

2. Caractéristiques des cellules différenciées obtenues :

L'apparition de sarcomères normaux, de triades et du couplage excitation-contraction sont des marqueurs de la différenciation terminale des cellules musculaires en culture.

Les cellules différenciées obtenues à partir de la lignée immortalisée de souris normales se contractent spontanément en culture et leur organisation sarcomérique peut être visualisée, alors que dans les myotubes *mdg* immortalisés obtenus conformément à l'invention, l'organisation sarcomérique est peu développée. Contrairement aux myotubes immortalisés normaux conformes à l'invention, le courant calcique de type L n'est pas retrouvé dans les cellules différenciées *mdg*.

Exemple 3 : Production de lignées cellulaires endothéliales conformes à l'invention et cellules différenciées, obtenues à partir de ces lignées.

a. Immortalisation de cellules endothéliales :
Les cellules endothéliales de porc et de lapin sont recueillies, à partir d'échantillons de sang, par ponction veineuse dans des tubes héparinisés suivie d'une centrifugation sur Ficoll ($d=1,09$). Les cellules endothéliales humaines sont recueillies, après une digestion limitée à la collagénase, des veines du cordon ombilical ou des vaisseaux du cerveau ; ces cellules sont mises en culture dans des récipients de culture recouverts de gélatine, avec un milieu DMEM supplémenté avec du sérum de veau foetal à 10 %, de la glutamine à 2 mM et des antibiotiques, incubées à 37°C en atmosphère humidifiée contenant 10 % de CO₂.

Entre 500 et 2000 cellules sont individuellement microinjectées dans leurs noyaux, avec un plasmide pHuVim830-T/t linéarisé (environ 3,5 kb), tel que décrit dans la Demande de Brevet européen n° 90402009.6, à savoir comprenant le gène codant pour l'antigène T

complet de SV40 (grand T et petit t) et la séquence comprise entre les nucléotides -830 et +93 du promoteur de la vimentine, linéarisé par digestion Sph I/BamH I dudit plasmide à une concentration de 2 ng/ μ l dans un tampon Tris-EDTA. La microinjection de ce plasmide dans le noyau desdites cellules est suivie de l'intégration et de l'expression de l'antigène grand T dans les cellules dérivées. La quantité injectée est d'environ deux fois supérieure à la taille du noyau.

2. Caractéristiques de la multiplication cellulaire :

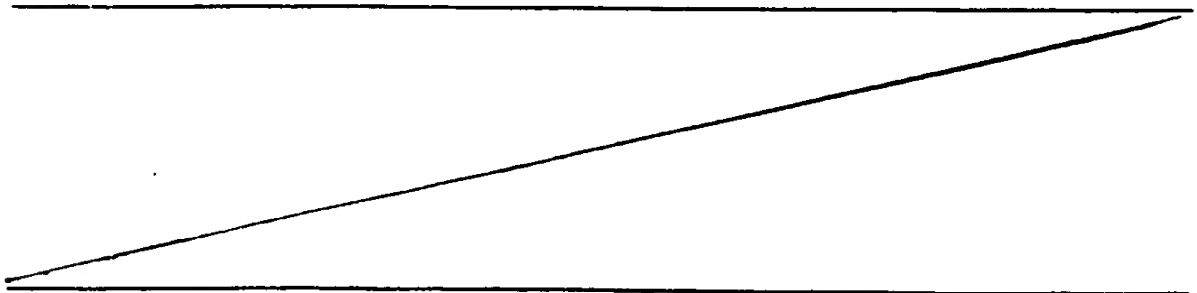
L'efficacité du clonage est testée sur des plaques contenant 50 puits de culture de 10 mm de diamètre, lesquels puits sont inoculés avec 1-10 cellules. Les courbes de croissance sont établies à partir de trois plaques, en utilisant des cellules COS comme référence. La croissance dans un milieu semi-solide est réalisée comme décrit par GIMBRONE et al. (Cell, 1976, 2, 685-693), avec du DMEM supplémenté en sérum de veau foetal à 10 %.

Trois semaines après la microinjection, des foyers multicouches de cellules apparaissent dans toutes les cultures primaires, envahissant les cellules résiduelles. De tels foyers n'apparaissent jamais dans les cultures contrôle, dans lesquelles la monocouche confluyente de cellules subit une dégénération spontanée en 3 à 5 semaines.

Les caractéristiques des lignées cellulaires

30

35



obtenues sont résumées dans le tableau I ci-après :

	COMPOTEMENT CELLULAIRE	ENDOTHELIUM LAPIN	ENDOTHELIUM PORC	ENDOTHELIUM HUMAIN	
				Clone 1	Clone CEH
5	Nombre de passages	60	20	15	15
	Temps de doublement (SVF 10 %)	20h	36h	66h	32h
10	Temps de doublement (SVF 5 %)	34h	40h	-	35h
	Temps de doublement (SVF 0,1 %)	41h	-	-	-
15	Capacité de clonage	+	+	+	+
	Présence de foyers	+	-	-	-
20	Croissance dans milieu semi-solide	+	-	-	-

20 L'antigène T intranucléaire est identifié à l'aide d'un anticorps monoclonal de souris et un anticorps de lapin anti-souris conjugué avec un de la fluorescéine, après fixation à l'éthanol-acétone (7/3), pendant 6 minutes à 20°C ; les filaments intermédiaires sont

25 détectés par immunofluorescence indirecte en présence d'un anticorps monoclonal de souris anti-vimentine (Amersham) ; la mise en évidence du facteur VIII est réalisée comme décrit dans Little et al. (J. Pathol., 1986, 149, 89-95), en utilisant un anticorps de lapin anti-facteur

30 VIII (Zymed Laboratories)

La figure 4 représente l'immunofluorescence indirecte obtenue, lorsqu'une lignée cellulaire immortalisée, réalisée à partir de cellules endothéliales immortalisées, est mise en contact avec des anticorps monoclonaux anti-protéine T.

35

L'analyse de l'ADN génomique révèle que le gène recombinant est intégré (figure 5). Cette figure représente l'intégration du plasmide pHuVim830T/t dans les cellules : l'ADN des cellules immortalisées est
5 traité par l'enzyme de restriction Hinc II, puis est soumis à une électrophorèse sur gel, suivie d'un transfert sur bande de nitrocellulose ; on procède ensuite à une incubation avec une sonde d'ADN marquée au ^{32}P (^{32}P dCTP), correspondant au fragment codant pour l'antigène T
10 (les 632 derniers nucléotides du gène SV40 T (Amersham Multiprime kit) ; si le fragment est effectivement intégré, on observe une bande d'environ 1 kb.

b. Arrêt de la multiplication desdites lignées immortalisées :

15 Dès que l'on transfère les cellules immortalisées telles que préparées ci-dessus, sur un milieu dépourvu en sérum ou contenant moins de 1 % de sérum, lesdites cellules gardent les propriétés caractéristiques des cellules endothéliales, notamment la production de
20 facteur VIII.

Exemple 4 : Production de lignées cellulaires épithéliales conformes à l'invention et cellules différenciées, obtenues à partir de ces lignées.

a. Immortalisation de cellules :

25 . les cellules épithéliales de glande mammaire de lapin sont obtenues après digestion de ces tissus par la collagénase ;

. les cellules épithéliales d'oviductes bovins sont récoltées après lavage des oviductes avec un milieu
30 DMEM.

Les cellules sont microinjectées comme décrit à l'exemple 3, ci-dessus.

Les caractéristiques des lignées cellulaires obtenues sont résumées dans le tableau II ci-après :

	COMPORTEMENT CELLULAIRE	EPITHELIUM MAMMAIRE LAPIN	EPITHELIUM D'OVIDUCTE BOVIN
5	Nombre de passages	55	30
	Temps de doublement (SVF 10 %)	22h	20h
	Temps de doublement (SVF 5 %)	22h	22h
10	Temps de doublement (SVF 0,1 %)	35h	-
	Capacité de clonage	+	+
	Présence de foyers	-	-
15	Croissance dans milieu semi-solide	+	-

b. Arrêt de la multiplication desdites lignées immortalisées :

20 Dès que l'on transfère les cellules immortalisées telles que préparées ci-dessus, sur un milieu dépourvu en sérum ou contenant moins de 1 % de sérum, lesdites cellules gardent les propriétés caractéristiques des cellules épithéliales, notamment la détection des
25 filaments intermédiaires, par immunofluorescence indirecte en présence d'un anticorps monoclonal de souris anti-kératine.

De telles cellules immortalisées trouvent notamment application pour servir de cellules nourricières aux embryons de bovins lors du sexage des
30 embryons.

Exemple 5 : Souris transgénique.

On microinjecte 70 oeufs au stade une cellule avec un fragment linéarisé du plasmide pHuVim830-^{ts}T/Δt
35 puis on transfère lesdits oeufs dans les oviductes de 35 souris. L'analyse en ADN des cellules de la queue par la

méthode de Southern montre que 3 jeunes souris sont transgéniques. Les souris transgéniques obtenues expriment le gène T de SV40 et trouvent notamment application dans l'étude dans la tumorigénécité *in vivo* et comme
5 source de cellules immortalisées, dans la mesure où le promoteur HuVim830 est inductible en culture *in vitro*.

Le croisement d'une souris transgéniques "VimT" avec un mutant *mdg* ou un mutant *mdx* conduit à un animal dont les cellules mises en culture sont à la fois
10 immortelles et portent la mutation précitée.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en
15 embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

MICRO-ORGANISMES	
Feuille facultative relative au micro-organisme mentionné en page 5, ligne 22 de la description	
A. IDENTIFICATION DU DÉPÔT :	
D'autres dépôts sont identifiés sur une feuille supplémentaire <input checked="" type="checkbox"/>	
Nom de l'institution de dépôt *	
Collection Nationale de Cultures de Microorganismes	
Adresse de l'institution de dépôt (y compris le code postal et le pays) *	
25 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS Cédex 15 (FRANCE)	
Date du dépôt *	N° d'ordre *
7 décembre 1990	I-1019
B. INDICATIONS SUPPLÉMENTAIRES : (à ne remplir que si nécessaire). Une feuille séparée est jointe pour la suite de ces renseignements <input type="checkbox"/>	
"En ce qui concerne les désignations dans lesquelles un brevet européen est demandé, un échantillon du microorganisme déposé ne sera accessible, jusqu'à la publication de la mention de délivrance du brevet européen ou jusqu'à la date à laquelle la demande sera rejetée, retirée ou réputée retirée, que par la remise d'un échantillon à un expert désigné par le requérant. (Règle 28.4) de la CBE)".	
C. ÉTATS DÉSIGNÉS POUR LESQUELS LES INDICATIONS SONT DONNÉES : (si les indications ne sont pas données pour tous les États désignés)	
ETATS-UNIS EUROPE JAPON	
D. INDICATIONS FOURNIES SÉPARÉMENT : (à ne remplir que si nécessaire)	
Les indications énumérées ci-après seront soumises ultérieurement au Bureau international * (spécifier la nature générale des indications p. ex., « N° d'ordre du dépôt »)	
E. <input type="checkbox"/> La présente feuille a été reçue avec la demande internationale lorsque celle-ci a été déposée (à vérifier par l'office récepteur)	
<div style="text-align: right;">09 DEC. 1991 (Fonctionnaire autorisé) E. DE MAEGD</div>	
<input type="checkbox"/> Date de réception (en provenance du déposant) par le Bureau international *	
<div style="text-align: right;">(Fonctionnaire autorisé)</div>	

MICRO- ORGANISMES

Feuille facultative relative au micro-organisme mentionné en page 5, ligne 28 de la description 1

A. IDENTIFICATION DU DÉPÔT :D'autres dépôts sont identifiés sur une feuille supplémentaire : ☒

Nom de l'institution de dépôt :

Collection Nationale de Cultures de Microorganismes

Adresse de l'institution de dépôt (y compris le code postal et le pays) :

25 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS Cédex 15 (FRANCE)

Date du dépôt :

7 décembre 1990

N° d'ordre :

I-1020

B. INDICATIONS SUPPLÉMENTAIRES : (à ne remplir que si nécessaire). Une feuille séparée est jointe pour la suite de ces renseignements ☐

"En ce qui concerne les désignations dans lesquelles un brevet européen est demandé, un échantillon du microorganisme déposé ne sera accessible, jusqu'à la publication de la mention de délivrance du brevet européen ou jusqu'à la date à laquelle la demande sera rejetée, retirée ou réputée retirée, que par la remise d'un échantillon à un expert désigné par le requérant. (Règle 28.4) de la CBE)".

C. ÉTATS DESIGNÉS POUR LESQUELS LES INDICATIONS SONT DONNÉES : (si les indications ne sont pas données pour tous les États désignés)

ETATS-UNIS
EUROPE
JAPON

D. INDICATIONS FOURNIES SÉPARÉMENT : (à ne remplir que si nécessaire)

Les indications énumérées ci-après seront soumises ultérieurement au Bureau International : (spécifier la nature générale des indications p. ex., « No d'ordre du dépôt »)

E. ☐ La présente feuille a été reçue avec la demande internationale lorsque celle-ci a été déposée (à vérifier par l'office récepteur)

(Fonctionnaire autorisé)

E. DEMAREGD

☐ Date de réception (en provenance du déposant) par le Bureau International : "

(Fonctionnaire autorisé)

MICRO-ORGANISMES

Feuille facultative relative au micro-organisme mentionné en page 6 , ligne 7 de la description 1

A. IDENTIFICATION DU DÉPÔT 1D'autres dépôts sont identifiés sur une feuille supplémentaire 2 ☐

Nom de l'institution de dépôt 4

Collection Nationale de Cultures de Microorganismes

Adresse de l'institution de dépôt (y compris le code postal et le pays) 4

25 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS Cédex 15 (FRANCE)

Date du dépôt 4

3 décembre 1990

N° d'ordre 4

I-1016

B. INDICATIONS SUPPLÉMENTAIRES 7 (à ne remplir que si nécessaire). Une feuille séparée est jointe pour la suite de ces renseignements ☐

"En ce qui concerne les désignations dans lesquelles un brevet européen est demandé, un échantillon du microorganisme déposé ne sera accessible, jusqu'à la publication de la mention de délivrance du brevet européen ou jusqu'à la date à laquelle la demande sera rejetée, retirée ou réputée retirée, que par la remise d'un échantillon à un expert désigné par le requérant. (Règle 28.4) de la CBE).

C. ÉTATS DÉSIGNÉS POUR LESQUELS LES INDICATIONS SONT DONNÉES 3 (si les indications ne sont pas données pour tous les États désignés)

ÉTATS-UNIS
EUROPE
JAPON

D. INDICATIONS FOURNIES SÉPARÉMENT 8 (à ne remplir que si nécessaire)

Les indications énumérées ci-après seront soumises ultérieurement au Bureau international 9 (spécifier la nature générale des indications p. ex., «No d'ordre du dépôt»)

E. ☐ La présente feuille a été reçue avec la demande internationale lorsque celle-ci a été déposée (à vérifier par l'office récepteur)

(Fonctionnaire autorisé)

E. DEMAREG.D.

☐ Date de réception (en provenance du déposant) par le Bureau international 10

(Fonctionnaire autorisé)

REVENDEICATIONS

1. Lignées cellulaires immortalisées, caracté-
risées en ce qu'elles sont obtenues par transformation
appropriée de cellules primaires convenables, -issues
5 d'un organe d'animal approprié, notamment un mammifère ou
un oiseau, - par un fragment d'acide nucléique comprenant
un oncogène viral immortalisant approprié, au moins un
fragment des régions régulatrices du gène humain de la
vimentine et éventuellement un gène dépourvu de son
10 promoteur, mais dont l'activité est aisément détectable
soit par un test enzymatique simple, soit par le fait
qu'il confère une résistance à un antibiotique.

2. Lignées cellulaires selon la revendication
1, caractérisées en ce que l'oncogène viral immortalisant
15 est choisi dans le groupe qui comprend l'oncogène T/t de
SV40, l'oncogène ^tST/ Δ t de SV40, l'oncogène T/ Δ t de SV40
et la région du gène immortalisant de l'adénovirus, du
virus Eptsein-Barr ou du virus herpétique.

3. Lignées cellulaires selon la revendication
20 1 ou la revendication 2, caractérisées en ce que le frag-
ment des régions régulatrices du gène humain de la vimen-
tine est, de préférence, le promoteur de la vimentine et
plus particulièrement le fragment d'acide nucléique du
promoteur de la vimentine, compris entre les bases -830
25 et +93 de la séquence régulatrice de la vimentine.

4. Lignées cellulaires selon la revendication
3, caractérisées en ce que le fragment d'acide nucléique
du promoteur de la vimentine comprend les bases -830 à -
529 et/ou le fragment -540 à -140, situés en amont du
30 site cap.

5. Lignées cellulaires selon l'une quelconque
des revendications 1 à 4, caractérisées en ce que les
cellules primaires sont avantageusement choisies dans le
groupe qui comprend les cellules musculaires précurseurs
35 de mammifère et plus particulièrement les myoblastes, les

cellules épithéliales de mammifère et les cellules endothéliales de mammifère.

6. Lignées cellulaires selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisées en ce que les cellules musculaires précurseurs sont choisies dans le groupe qui comprend les myoblastes normaux de souris, les myoblastes mutants de souris et les myoblastes mutants humains.

7. Lignées cellulaires selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisées en ce qu'elles sont obtenues par transfection de cellules primaires appropriées par un plasmide choisi dans le groupe qui comprend le plasmide pHuVim830-^{ts}T/Δt, le plasmide pHuVim830-T/Δt et le plasmide pHuVim830-T/t

8. Lignée cellulaire selon la revendication 7, dénommée HVM, caractérisée en ce qu'elle a été obtenue par transfection de myoblastes normaux de souris par un plasmide pHuVim830-^{ts}T/Δt et a été déposée sous le n° I-1019 en date du 7 décembre 1990 auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes tenue par l'INSTITUT PASTEUR.

9. Lignée cellulaire selon la revendication 7, dénommée HVMd, caractérisée en ce qu'elle a été obtenue par transfection de myoblastes mutants mdg de souris par un plasmide pHuVim830-^{ts}T/Δt et a été déposée sous le n° I-1020 en date du 7 décembre 1990 auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes tenue par l'INSTITUT PASTEUR.

10. Lignées cellulaires selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisées en ce qu'elles sont obtenues par microinjection d'une séquence linéaire d'un acide nucléique appropriée, obtenue à partir d'un plasmide choisi dans le groupe qui comprend le plasmide pHuVim830-^{ts}T/Δt, le plasmide pHuVim830-T/Δt et le plasmide pHuVim830-T/t, dans des cellules primaires convenables.

11. Lignée cellulaire selon la revendication 10, dénommée HVE, caractérisée en ce qu'elle a été obtenue par microinjection d'un plasmide pHuVim830-T/t linéarisé dans des cellules endothéliales humaines du cordon ombilical et a été déposée sous le n° I-1016 en date du 3 décembre 1990 auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes tenue par l'INSTITUT PASTEUR.

12. Procédé d'obtention de cellules musculaires (myotubes) différenciées, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

(a) culture d'une lignée de cellules musculaires selon l'une quelconque des revendications 5 à 9, comprenant un plasmide contenant un oncogène viral immortalisant thermosensible, sur un milieu approprié contenant une quantité appropriée de sérum d'un animal convenable, à une température comprise entre 34°C et 36°C, permettant l'expression conditionnelle d'une protéine virale, et notamment de l'antigène ^tST et une multiplication cellulaire importante ;

(b) modification de la température des cellules en culture à une température comprise entre 38°C et 40°C, associée, éventuellement, à une modification du milieu de culture, notamment par diminution de la concentration en sérum dudit milieu et/ou utilisation d'un sérum d'un animal différent de celui de l'étape (a) ; et

(c) obtention de cellules différenciées en grand nombre par culture desdites cellules dans les conditions appropriées à la différenciation de l'étape (b).

13. Procédé d'obtention de cellules musculaires (myotubes) différenciées, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

(a) culture d'une lignée cellulaire musculaire immortalisée selon l'une quelconque des revendications 5 à 9, comprenant un plasmide contenant un oncogène viral immortalisant, notamment un plasmide choisi dans le

groupe qui comprend le plasmide pHuVim830-T/t et le plasmide pHuVim830-T/ Δ t, sur un milieu approprié, contenant une quantité convenable de sérum d'un animal convenable, à une température appropriée notamment 37°C ;

5 (b) modification du milieu de culture, notamment par diminution de la concentration en sérum dudit milieu ;

(c) obtention de cellules différenciées en grand nombre par culture desdites cellules dans les conditions appropriées à la différenciation de l'étape 10 (b).

14. Procédé d'obtention de cellules épithéliales ou endothéliales différenciées, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

15 (a) culture d'une lignée cellulaire épithéliale ou endothéliale selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, 7, 10 ou 11, en présence d'un agent d'activation approprié qui conditionne l'expression d'une protéine virale appropriée et notamment de l'antigène T 20 en présence du promoteur de la vimentine et permet une multiplication cellulaire importante ;

(b) transfert de ladite lignée immortalisée dans un milieu dépourvu en agent d'activation et/ou à une température comprise entre 37°C et 40°C ; et

25 (c) obtention de cellules différenciées en grand nombre.

15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que l'agent d'activation est notamment choisi dans le groupe qui comprend l'antigène T lui-même 30 et des agents mitogènes appropriés.

16. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que l'agent mitogène est notamment choisi dans le groupe qui comprend les sérums, les facteurs de croissance tels que le PDGF, l'EGF ou le FGF, 35 l'interleukine II, les interférons et la phytohématagglutinine (PHA).

17. Cellules différenciées, caractérisées en ce qu'elles sont obtenues par l'un quelconque des procédés d'obtention de cellules différenciées selon l'une quelconque des revendications 12 à 16.

5 18. Agent à visée préventive et/ou thérapeutique, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une cellule différenciée selon la revendication 17, éventuellement modifiée par adjonction d'un fragment d'acide nucléique approprié et éventuellement associée à au moins
10 un véhicule pharmaceutique approprié.

19. Agent à visée préventive et/ou thérapeutique, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une lignée cellulaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, éventuellement modifiée par adjonction d'un
15 fragment d'acide nucléique approprié et éventuellement associée à au moins un véhicule pharmaceutique approprié.

20. Modèle d'étude et d'identification des systèmes biochimiques dont l'expression nucléaire, cytoplasmique ou membranaire est impliquée dans la prolifération et la différenciation cellulaire des cellules musculaires, épithéliales, endothéliales ou nerveuses, caractérisé en ce qu'il est constitué par une lignée cellulaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 11.

21. Séquence d'acide nucléique, caractérisée
25 en ce qu'elle comprend successivement :

- une séquence codant pour l'antigène grand T de SV40, ne comportant pas le fragment codant pour l'antigène petit t, laquelle séquence est thermosensible, ou un fragment de celle-ci ; et
- 30 - une séquence comprenant au moins un fragment du promoteur de la vimentine humaine, d'une longueur de 830 paires de bases à partir du site cap ou un fragment de celle-ci, notamment le fragment -830 à -529 et/ou le fragment -540 à -140, en amont du site cap ; et, éventuellement
35

- un gène, dépourvu de son promoteur, mais dont l'activité est aisément détectable soit par un test enzymatique simple, soit par le fait qu'il confère une résistance à un antibiotique.

5 22. Vecteur d'expression, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'acide nucléique selon la revendication 19, lequel vecteur est apte à immortaliser une lignée cellulaire appropriée.

10 23. Méthode de production d'un mammifère transgénique non humain, caractérisée en ce qu'elle comprend l'introduction d'un plasmide choisi dans le groupe qui comprend le plasmide pHuVim830-T/t, le plasmide pHuVim830-T/ Δ t et le plasmide pHuVim830-^{ts}T/ Δ t dans un mammifère non humain à un stade embryonnaire précoce.

15 24. Mammifère transgénique non humain, caractérisé en ce qu'il est obtenu par la méthode selon la revendication 23, et en ce que les cellules comprenant le plasmide choisi dans le groupe qui comprend le plasmide pHuVim830-T/t, le plasmide pHuVim830-T/ Δ t et le plasmide
20 pHuVim830-^{ts}T/ Δ t, peuvent se différencier normalement *in vivo*, tout en pouvant produire des cellules précurseurs immortalisées *in vitro*.

1 / 2

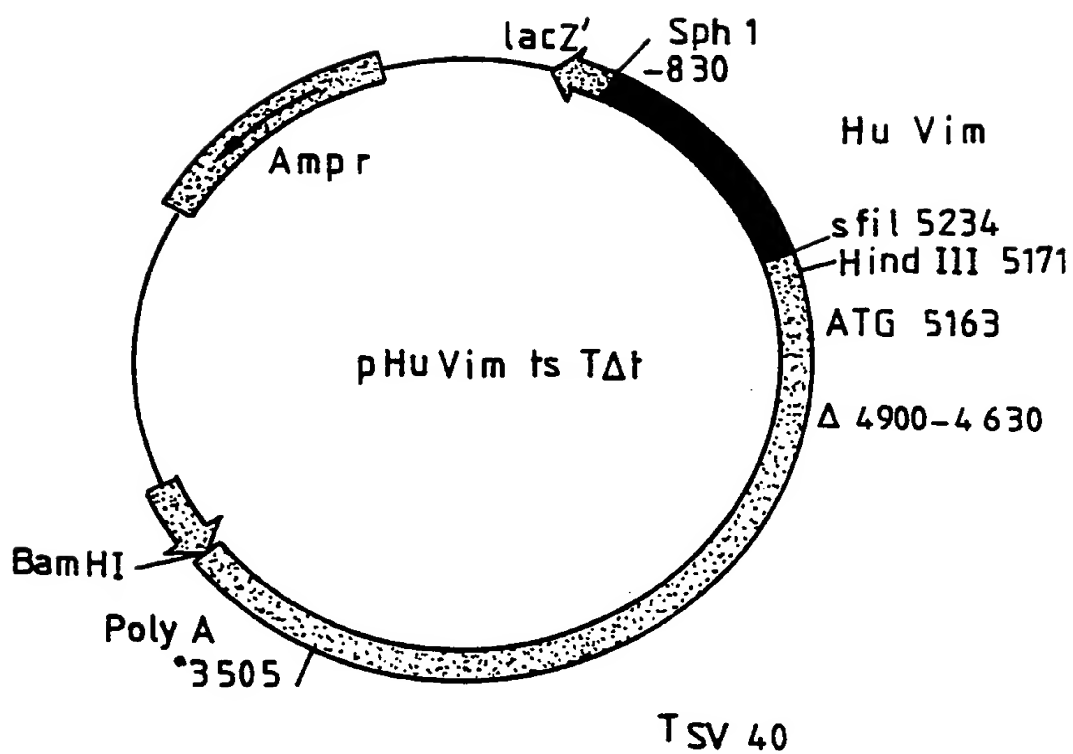
FIG. 1

FIG. 2A

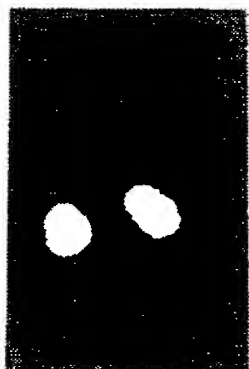


FIG. 3A

FIG. 2B



FIG. 3B

FIG. 4



FIG. 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR91/00983

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) ⁶		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
IPC ⁵ : C12N 5/10; C12N 15/12; C12N 15/37; C12N 15/85 C12N 15/89; A61K 48/00; A01K 67/027		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
IPC ⁵	C12N	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are included in the Fields Searched ⁸		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹		
Category ¹⁰	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
Y	WO, A, 8909816 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 19 October 1989 (cited in the application)	1, 18, 21-24
A		2, 7, 10, 19
Y	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY volume 7, No. 11, November 1987, WASHINGTON US pages 3905 - 3915; S.R. RITTLING ET AL.: "functional analysis and growth factor regulation of the human vimentin promotor"	1, 18, 21-24
A	see the whole document	3, 4, 14
A	GB, A, 2196985 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS) 11 May 1988 see abstract	1, 2, 7-10
A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH volume 17, No. 4, 1989, ARLINGTON VIRGINIA pages 1619 - 1633; S.R. RITTLING ET AL.: "AP-1/jun binding sites mediate serum inducibility of the human vimentin promotor" see abstract	1, 3, 4, 14, 18-24
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>¹⁰ Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Mailing of this International Search Report
20 March 1992 (20.03.92)		22 April 1992 (22.04.92)
International Searching Authority		Signature of Authorized Officer
European Patent Office		

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
A	US, A, 4808532 (MARTHA R., STAMPFER) 28 February 1989 see abstract	14-17
A	EP, A, 0187556 (A PARTNERSHIP OF HARVEY B. POLLARD ET AL.) 16 July 1986 see abstract	14-17
A	EP, A, 0227102 (WAKAMOTO PHARMACEUTICAL CO.) 1 July 1987 see abstract	12,13
A	EP, A, 0351921 (MERCK & CO. INC.) 24 January 1990 see abstract	23,24

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO. FR 9100983
SA 55114**

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 20/03/92

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-8909816	19-10-89	EP-A- 0428519 JP-T- 3504799	29-05-91 24-10-91
GB-A-2196985	11-05-88	None	
US-A-4808532	28-02-89	None	
EP-A-0187556	16-07-86	US-A- 4670394 JP-A- 61225128	02-06-87 06-10-86
EP-A-0227102	01-07-87	JP-A- 62153221	08-07-87
EP-A-0351921	24-01-90	JP-A- 2084121	26-03-90

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

CIB 5 C12N5/10; C12N15/89;	C12N15/12; A61K48/00;	C12N15/37; A01K67/027	C12N15/85
-------------------------------	--------------------------	--------------------------	-----------

II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée⁸

Système de classification	Symboles de classification
---------------------------	----------------------------

CIB 5	C12N
-------	------

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté⁹

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS¹⁰

Catégorie ^o	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³	No. des revendications visées ¹⁴
Y	WO,A,8 909 816 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 19 Octobre 1989 cité dans la demande	1, 18, 21-24
A	----	2, 7, 10, 19
Y	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY vol. 7, no. 11, Novembre 1987, WASHINGTON US pages 3905 - 3915; S.R.RITTLING ET AL.: 'functional analysis and growth factor regulation of the human vimentin promotor'	1, 18, 21-24
A	voir le document en entier	3, 4, 14
A	GB,A,2 196 985 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS) 11 Mai 1988 voir abrégé	1, 2, 7-10
	----- -/-	

^o Catégories spéciales de documents cités:¹¹

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.
- "A" document qui fait partie de la même famille de brevets

IV. CERTIFICATION

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
20 MARS 1992	22 APR 1992 ¹
Administration chargée de la recherche internationale OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	Signature du fonctionnaire autorisé GURDJIAN D. <i>M. Gurdjian</i>

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS¹⁴(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDiques SUR LA
DEUXIEME FEUILLE)

Catégorie *	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
A	<p>NUCLEIC ACIDS RESEARCH vol. 17, no. 4, 1989, ARLINGTON VIRGINIA pages 1619 - 1633; S.R.RITTLING ET AL.: 'AP-1/jun binding sites mediate serum inducibility of the human vimentin promotor' voir abrégé</p>	1,3,4, 14,18-24
A	<p>US,A,4 808 532 (MARTHA R.,STAMPFER) 28 Février 1989 voir abrégé</p>	14-17
A	<p>EP,A,0 187 556 (A PARTNERSHIP OF HARVEY B.POLLARD ET AL.) 16 Juillet 1986 voir abrégé</p>	14-17
A	<p>EP,A,0 227 102 (WAKAMOTO PHARMACEUTICAL CO.) 1 Juillet 1987 voir abrégé</p>	12,13
A	<p>EP,A,0 351 921 (MERCK & CO.INC.) 24 Janvier 1990 voir abrégé</p>	23,24

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9100983
SA 55114

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets. 20/03/92

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-8909816	19-10-89	EP-A- 0428519 JP-T- 3504799	29-05-91 24-10-91
GB-A-2196985	11-05-88	Aucun	
US-A-4808532	28-02-89	Aucun	
EP-A-0187556	16-07-86	US-A- 4670394 JP-A- 61225128	02-06-87 06-10-86
EP-A-0227102	01-07-87	JP-A- 62153221	08-07-87
EP-A-0351921	24-01-90	JP-A- 2084121	26-03-90

EPO FORM P0472

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82